(12) 公開特許公報(4) (19)日本国际部庁 (JP)

(11)物許出限公司命号

特開平10-45738

(43)公開日 平成10年(1998) 2月17日

(51) Int.Cl.	11 911639	庁内数理器時	н П				技術表示體所
C 0 7 D 303/38			C 0 7 D 303/38	38			
A 6 1 K 31/335	ABG		A 6 1 K 31/335	335	ABG		
C12F 17/02			C 1 2 P 17/02	20/			
# (C 1 2 P 17/02							
C12R 1:01)							
			新连路 块	米雪米	審査額次 未替次 酸水垣の数3 01 (全15月)	70	金15月)

		代数例像	審査部状 未配状 耐水塩の数3 0L(全 15 頁)
(21) 出国库号	\$ 红	(1)田間((71) 出國人 000173913
			財団法人做生物化学研究会
(22)/HCDH	平成8年(1996)7月29日		東京都品川区上大崎3丁月14番23号
		(72) 発明者	七七 明禁
			東京都島川区東五茂田6丁目1番11号 二
			ューフジマンション701
		(72) 発明者	土田 外志夫
			样來川県相関原巾矢郎2丁目3番24号 ハ
			ーモニー矢郎201号
		(72) 発明者	中村光
			東京都台東区入谷2丁目30番地9号
		(74)代理人	弁理士 八木田 茂 (外2名)
			是株式に祝く

(54) 【兜明の名称】 - 抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDとその製造技ならびに対りウマチ剤

(57) (野村)

【原因】 抗リウマチ活性を有し且つ新しい分子母格を **凢する析規な化合物を提供することを目的とする。** 【解准单段】 一般共(1)

Э

エボキシキノマイシンCおよびエボキシキノマイシンD が析机な抗生物質としてアミコラトプシス sp. MX299-9 エボキシキノマイシンDでは塩煮を示す)で扱わされる 5F4 株の協養により得られた。エボキシキノマイシンC およびり、あるいはそれらの塩は抗リウマチ活性を有す る抗生物質である。また、先にほられた新規な抗生物質 **たちも エボキシサントイツンA およびエボキシサンレイ** (式中、RはエボキシキノマイシンCでは水煮を示し、 シンHも抗リウマチ活性を有することが見いだされた。 BEST AVAILABLE COPY

[相求項1] 次の一般式(1) 【特許別求の範囲】

Ξ

(式中、RはエポキシキノマイシンCでは水素原子を示 で扱わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシ し、またエポキシキノマイシンDでは協業原子を示す) ンCおよびエポキシキノマイシンD、またはそれらの

Cおよび(または) Dを採取することを特徴とする. 抗 生物質エポキシキノマイシンCおよび(または)エポキ に記載のエポキシキノマイシンCねよびDの生産菌を栄 集協地に協養し、その協働物からエポキシキノマイシン 【精求項2】 アミコラトプシス属に属する、精求項1 シキノレイシンDの製造符。

【類求項3】次の一般式(1)

Э

(式中、RはエポキシキノマイシンCでは水敷原子を示 で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシ ンCおよびエポキシキノマイシンD、ならびに次の一般 し、またエポキシキノマイシンDでは塩素原子を示す)

ンAおよびエポキシキノマイシンB、あるいはこれらの塩から選ばれる少なくとも一つの化合物を有効成分とし (式中、RはエポキシキノマイシンAでは塩素原子を示 で表わされる化台物である抗生物質エポキシキノマイシ し、またエポキシキノマイシンBでは水素原子を示す) て含有することを特徴とするリウマギ剤。 [発明心群細な説明]

[発明の属する技術分野] 本発明は、抗リウマ年活性を 示す新規化合物であるエポキシキノマイシン(Epoxyquin およびエポキシキノマイシンBまたはそれらの塩のうち oalcin) こおよびエポキシキノマイシンD、あるいはこ さらに本発明は、エポキシキノマイシンCおよび(また は)エポキシキノマイシンD、エポキシキノマイシンA れらの塩に関し、またエボキシキノマイシンCおよび (または) エボキシキノマイシンDの製造法に関する。

特開平10-45738

2

り、また値々な多数の抗腫病性物質が知られている。他 方、従来のリウマデ治療には、ステロイド剤、酸性抗炎 【従来の技術】増々な多数の抗菌性物質が知られてお 症剤または免疫調節剤等が使われている。 [0002]

の少なくとも一つの化合物を有効成分とする抗リウマチ

[発明が解決しようとする課題] 細菌形原症の化学療法 において、従来知られまたは使用されている既知の抗菌 に窒まれている。また抗腫病性物質は、一般に強い専性 を有するものが多く、専性が低く且つ新規な化学構造を 有する抗腫病性物質を発見または制製することが常に質 性化合物とは、異なる化学構造を育し且つ優れた抗菌活 性を示す新しい化合物の発見または創製をすることは常 まれており、そのための母究が行われている。 [0000] 8

【0004】また、従来のリウマギ治療で用いられたス テロイド刻および免疫調節剤には、慢々の副作用がある ことが問題であり、また酸性抗災症制は対症療法である れている。そこで、リウマチの治療または予防に有効で あり且つ副作用がないまたは弱い斬視な抗リウマチ刺を **等の問題から、其にな効なリケマチ治療薬の出現が留ま** 提供することが要留されている。本発明の主な目的の一 つは、新規な抗リウマチ剤を提供することにある。

【腺題を解決するための手段】先に、本発明者らは、抗 国活性および抗腫病活性を持つ新規な抗生物質を提供す ることを目的に、従来より有用な抗生物質の開発と専用 化の研究を促進してきた。その結果、土壌試料から新規 な商生物としてアミコラトプシス属に属する菌株を分離 ミコラトプシスsp. NK 299~95F4株が新しい・構造骨格を することに成功し、またこの間状について命名されたア **育する複数の抗生物質を生産していることを見い出し** [0005]

の細菌に抗菌活性を示し、また循細胞の情報を抑制する 前腫瘍活性を育することを見い出した(平成7年12月 4 アイシンBと命名した。更に、これらの新規抗生物質が 薬剤芸性質(メチシリン製性菌等)をふくむ グラム原性 た。これら新規抗生物質2種を単離することに成功し、 それぞれにエボキシキノマイシンAなよびエボキシキ、 日出版の特層平 7-315542号明細質が照)。

【0006】更に、本発明者与は研究を進めたが、その

3

帯部中10-45738

Bよび B と化学情选母格が共通するが別段の新規な化合 192個を生産していることを見いだした。今回、これら Hボギッキ / マイシンC およびエボキシキ / マイシンD マイシンAおよびB生産的は、エポキシキノマイシンA 所規な化合物2億を単離することに成功し、それぞれに **冶甲、アミコサトプシス階に属する前配のエポキシキノ** と思わった。 【0007】また、本経明哲与は、微生物の代謝産物の **行なっていたので、今回発見したエポキシキノマイシン** CなよびエポキシキノマイシンDが抗リウマチ活性を有 **ホノマイシンCおよびエボキシキノマイシンDが優性関** 節リウァチの動物異数モデルであるコシーゲン結発関節 **歧を抑制することを見いだした。また、先に本発明都ら** 中から抗リウマチ活性を示す物質を検索する研究を鋭意 するか研究した。その結果、本発明にかかわるエポキシ が発見したエポキシキノマイシンA およびエポキシキノ マイシンBも抗リウマチ活性を有することを見いだし

シキンヤイツンC およびエポキシキノマイツンDは、特 **定の間的に対して弱い抗菌活性を示したが、各種の癌細** 【0008】なお、水発明有らが今回新たに得たエポキ 因の増殖を抑制する活性がかなり低いことが認められ た。これらの知見に基づいて、本発明が完成された。

【ロロロ9】従って、類1の本発明においては、次の一

F) 高分解能マススペクトル: 実践値 292.0821 (M+H)・

292.0804 部位は

1) 赤外線吸収スペクトル (KBr 監列法): 添付図画 の図2に示す。 ş

J) 13 C-NMRスペクトル (CD3 OD/TMS):商

付図画の図4に示す。

(III) 0.01N RCIーメタノール商徒中で測定したUV吸

クロ状のとおりてある。

A max 12 (E) 304 (18270), 364 (9750)

ークは次のとおりてある。

長又くクトデコ登4四回の図しに保証で出す。 出なパー

(式中、RはエポキシキノマイツンCでは水素原子を示 **げエポキシキノマイシンロ、おるいはこれらの塩が提供** で表わされる化合物であるエポキシキノマイシンにおよ し、またエポキシキノマイシンDでは塩素原子を示す)

協などの有機協議との協、あるいは各種金属との協、例 えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、こ 【0010】エポキシキノマイシンCおよびDは、駒酸 性物質であり、それらの塩としては第4級アンモニウム

【0011】次に、杭生物質コポキツキノマイツンC お れらの塩も上配の抗リウマチ活性を有する。

よびDの理化学的性状を記載する。

(1) エボキシキノマイシンCの理化学的性状 A) 外観及び性質:白色粉体、弱酸性物質

B) 融点: 168-172°C (分解)

C) 比較光度: (a) 🕫 + 128。 (c 1.0, メタノー

D) TLCのR「値:0.31 €

シリカゲル (Art.105715, メルク社製) の薄磨クロマト ゲラフィーで風間溶媒としてクロロホルムーメタノール (10:1) で展開して到定した場合

E) マススペクトル (m,/z) : 292 (M+H)・ 290 (M-H) ·

λ Box rm (ε) 296(18140)

11) 紹外は吸収スペクトル: G) 分子共: Cia Hia NOs

vmax(cm-1) 3431, 1604, 1537, 1460, 1309, 1232, 1 065, 750 (二) メルノーと治療中で遺跡したDV取長スペケトラ は部付四国の図1に実績で示す。主なピークは次のとお

K) - H-NNRスペクトル (CD: OD/TMS):液 4四回の図3に示す。

(II) 0.01N NAOHーメルノード的済中で資訊したロV **収収 スペクト ごは 独立図目の図した。近様で 下す。 虫な ア**

λ max ra (ε) 297(17430)

りである。

(2) エポキシキノマイシンDの塩化学的性状

A) 外観及び性質:黄かっ色粉は、調整性物質 B) 融点:163-168で(分解) C) 比較光度:(a) - ½ + 142。(c 1.0, メッノー

€

特闘平10-45738

ゲサフィーで 風間浴媒 としてクロロホルムーメかノール (10:1) で展開して側定した場合

. (H+W) E) マススペクトル (m/z) : 326

シリカゲル (Art.105715, メルク社製) の荷磨クロマト

D) TLCのRf値:0.10

324 (M-H) ·

F) 高分解能マススペクトル: 実数値 326.0431 (M+H)・

計算億 326.0417

1.1雄性マウスを用いて聞べた。すなわち、タイプココラ ーゲンを等容器のフロイントのコンプリートアジュバントと共に乳化して 1mg/mlの投与液を作製した。これを マウスの尾根町の皮内に 0.1ml後値して感作した。3週 間後に同様の操作方法で乳化したテイブロコラーゲンの 0.1mlをマウスの腹腔内に投与して追加免疫を行ない関 節炎を誘発させた。 5

(1) メタノール溶液中で遡定した U V 吸収スペクトル

G) 分子式: Cir Hiz NOs C 1 熊 女 都 収 収 ス ペ ク ト ル : を抵付図面の図5に実練で示す。主なピークは次のとお

(II) 0.01N NaOHーメタノール協議中で選定した吸収

A Bax rm (E) 299(17590)

りてある。

スペクトルは添付図画の図5に点様で示す。 主なピーク

(III) 0.01N HCIーメタノール協議中で資定したDVス ペクトラは疫付図画の図5に破壊で示す。 甘なパークは

λmax nm (ε) 304(18950), 367(9230)

は次のとおりである。

1) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠利法): 添付図面

A max ru (E) 297(18530)

次のとおりである。

J) " C-NMRスペクトル (CD) OD/TMS):商 K) - H-NMRスペクトル (CD, OD/TMS):商

位図画の図7に示す。

v max(cm⁻¹) 3438, 1643, 1533, 1281, 1200

の図らに示す。

付図面の図8に示す。さらに、抗生物質エポキシキノマ

の!ng/kgまたは 2ng/kgを最初のコラーゲン被債の日 上、あるいは手首、足首などの比較的大きな関節が発 赤、腫脹を示す場合、スコア3は1本の手や足全体が発 のみ発赤、腫脹を示す場合、スコア2は小間節が2本以 赤、鯉腿を示す場合、さらにスコア4は1本の手や足の 【0013】エポキシキノマイシンのA およびCの2mg /kgまたは 4mg/kg. ならびにエポキシキノマイシンB より1週間に3回、合計6週間腹腔内投与した。コラー ゲン熱発問節炎の哲制効果は前肢および後肢の発赤、瞳 の最高点は16)により評価した。スコアのは全く症状が みられない場合、スコア1は四肢の指など小関節が1本 全体的な腫脹が最大限に達し、しかも関節の強直を伴っ ていると判断した場合をそれぞれ示す。結果を喪!に示 腿および強直の程度による0~4のスコア(4肢の合計 R

[0014]

8

コラーゲン結発関節炎に対する効果を1群5~8のBM/ イシンにおよびDの生物学的住状を次に配載する。 【0012】A)コラーゲン既発閲節炎抑制作用

\$

特間平10-45738

9

(表1) ロシーゲン製物部砂灰砂塩合品

スコア:平均値上部停収施

対気間との間の食業施 + p < 0.05、 + + p < 0.01

8 /kg. エボキシキノマイシンBの1mg/kg. 2 mg/kg. およびエボキシキノマイシンCの4mg/kgは対象に関節 [0015] エポキシキノマイシンAの2mg/kg、4mg なのスコアを容置した。

の各種細菌に対する最低発育阻止濃度は、次の数2にし めず通りである。この抗菌スペクトルは日本化学療法学 会関準体に基ずき、ミュラーヒントン寒天培地で倍数希

駅注により製造した。 [0017]

【0016】B) 抗凹语性

|本発明による抗生物質エポキシキノマイシンCおよびD | (A2)

1	多位元明	是在発育阻止關底(pg/al)	
	ドボキシキノ トイワンC	4#4547 44520	
39tun+83.79V93.313	80	> 50	
3.9 Eco 3.4 63.7 60 60 4 15 8610	100	300	
スクヒロコッカス・アクレウス 19 16526	901	100	
パストレラ・ピシング 00,6395	05		_

キシキノレイシン ひなみび オボキシキノマイシン Dの道・8 各種の癌細胞を用いて癌細胞の物類を50%抑制するエボ 【0018】C) 福田四代為哲則活在

その結果を扱うに示す。

度 (ICsa 値) を、NTT法 (「Journal of Immunologica 1 Nethods J 65世, 55-60頁(1983)参照)で倒定した。

トポチンキノ マイシンロ 00 × × 100 5 š 1 C .. (#8/81) **スポキシキノ** サイツンの <u>ج</u> 5) | | | e ^ TOX INCORPILE マウス扇色暦 816-816 •

マウス白白角 しし210

エールリッヒ

#

锯

Ħ

ĸ

(第3)

[6100]

が死亡個体はなく、また事性症状も見られなかった。ま た、エポキシキノマイシンCの 4mg ^kg/日を1週間に 3回、合計6週間腹腔内に投与したが死亡個体および専 性症状を示す個体は見られなかった。エポキシキノマイ ICR系雄性マウスにエポキシキノマイシンCおよびエポ キシキノマイシンDの100mg/kgを腹腔内単回投与した シンCの適血動物に対する専性は非常に低い。 【0020】D) 专性

【0021】 扱2の結果から明らかなように、本発明に よるエポキシキノマイシンCおよびDは、特定の価値に 対して弱い抗菌活性を有するから抗菌剤として有用であ 5. しかし、扱3の結果から明らかなように、エポキシ キノマイシンCおよびDは各種の癌細胞の増殖を 100μ B/miで控制しなかった。

ポキシキノマイシンDを採取することを特徴とする、抗 [0022] さらに第2の本発明によれば、アミコラト マイシンCおよびDの生産菌を栄養培地に培養し、その **格量物からエポキシキノマイシンCおよび(または)エ** 生物質エポキシキノマイシンCおよび(または)エポキ プシス属に属する、前配の一般式(1)のエポキシキノ シキノマイシンDの製造法が提供される。

【0023】類2の本発明の方法で使用できるエポキシ

コラトプシス sp. NKS99-95F4 株がある。この箇株は平成6年10月、微生物化学研究所において、百成県仙台市 の土壌より分離された放標菌で、MK299-95F4の固株番号 キノマイシンCおよびDの生産間の一例としては、アミ が付された顔生物である。

【0024】このUK299-95F4株の菌学的性伏を次に配敵

1、形態 菌生菌糸はよく分枝し、ジクザグ代を困する。また分断 その表面は平滑であり、大きさは約 0 4~ 0.6× 1.1~ が認められる。気間全は直状あるいは不規則な曲伏で、 円商形~長円形の断片または粒子様の構造に分断する。

1.6ミクロンである。輸生技、団東糸、帽子のう及び選 動性粒子は配められない。

・ローボレーション・キブ・アメリカのカルー・ハーモ 色の記載について()内に示す標準は、コンティナー ニー・マニュアル (Container Corporation of America [0025] 2. 各種培地における生育状態 のcolor harmony manual) を用いた。

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと質生して、溶 (I) シュクロース・暗鼓協察天培地 (27°C培養) 解性色素は認められない。

(2) グルコース・アスパテギン寒天垢地 (27℃倍盤)

(3) グリセリン・アスパテギン寮天培地 (1.5.Pー培地 うす費(Zea. Lt Wiest~Zgc. Bamboo)の発身上に、 白の気筒糸を着生し、溶解性色素は食を帯びる。

うす質茶 (3ie, Comel ~3ie, Cinuamon) の発剤上 に、白の気菌糸を着生して、溶解性色素は黄茶を帯び 5、27℃培養) Ŕ

(4) スターチ・無機塩寒天塔地 (ISP-培地4、27℃

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生して、冷 解性色素は認められない。

【0026】(5) チロツン象沢語語 (1SP-語語7. 27℃倍度)

うず菌茶(31g. Mustard Jan)~灰味菌茶(31g. Ad obe Brown)の発育上に、白の気菌糸を替生し、溶解性 うす黄 (Zen, Lt Weat) の発育上に、白の気間名をう (6) 洪鰲摩天培地 (27℃培養) 色素はうす黄茶を呈する。

(1) メースト・帆和拳队信告 (1.5 P.1 信拍 2. 27 に指数)

っすらと甘生し、治解性色素は肥かられない。

亨亨莫森 (31c, Lt Amber) の発育上に、自の気間会を ラッずらと替出し、治療性色素は認められない。

8

特開平10-45738

9

特剛平10-45738

メートミール東天塔塔(1 S P - 培地3、21℃培

無色~うず故(I 1/2cn. Cream)の発育上に、白の気 団糸をうっすらと輩生し、溶解性色素は認められない。

無色の発育上に、白の気間糸をうっすらと着生して、冷 (9) スターチ専天培地 (27℃培養)

東色の発育上に、白の気団糸をうっすらと勧生して、洛 (10) リンゴ韓石灰象沢培也 (27℃培養) 野性白質は認みられない。

【0027】3. 生理的性質 解性色素は配められない。

(1) 生中温度範囲

した格界、いで、50℃での生力は認められず、20℃~37 で、24℃、27℃、30℃、37℃および50℃の各温度で試験 じの範囲で生育した。生育至適温度は27℃付近と思われ 0.05%、0七毫天 3.0%、 pH7.0) を用い、10℃、20 **サルコース・アスパサギン象沢協地(ゲルコース 1.0** 8、Lーアスパラギン0.05%、リン酸水煮ニカリウム

ISP-培地4及びスターチ専天培地、いずれも27℃培 (2) スターチの加水分解 (スターチ・無償協奪天培地)

ロス、「SP-街街」、ペプトン・イースト・転祭天頃 (3) メション葡萄費の虫成 (トリプトン・イースト・ブ 他、ISPI指袖の:チロツン象天塔袖、ISPI培袖 21日間の倍養で、いずれの時地においても陰性である。 7:いずれも27心倍量)

【0028】(4) 妖紫源の利用性 (プリドハム・ゴドリ Dーグルコース、Dーフルクトース、イノシトール、D ープ原天语档、1 S P → 培地9 : 27℃培養) いずれの倍地においても降性である。

(5) リンゴ酸石灰の溶解 (リンゴ酸石灰象天体地、27℃ **ーマンニトールを利用して発育し、Lーアラピノース、** シュクロース、ラムノース、ラフィノースは利用しない。 リーキシロースの利用の有無は判然としない。

15 整後 I 0 日 目頃よりソンゴ政石灰の溶解が認められ、

(6) 母韓祖の遠元反応(0.1%母韓カリウム合体ペプトン その作用は中等度である。

水、ISP-暗啮B、27心暗集) 陪住である。

ラーチの水解性及び硝酸塩の遠元反応はいずれも陰性で 80 **聞し、分断を認める。気面糸は直状あるいは不規則な曲** まれ、四個形へ東田形の原作者たは関子数の構造に分析 する。輸生技、固束糸、胞子のう及び運動性胞子は認め ないない。 置りの語音で、無面しゃき数しゃき登扱の語 月上に白の気質糸を質生する。一部の塔地で溶解性色素 は、その形態上、基生菌糸はよく分枝し、ジグザク状を は何あるいは包茶を作げる。メデニン数色素の生成、ス 【0029】以上の性伏を契約すると、MK299-95F4株

【0030】ところで、NK299-85F4株の箇体成分は、笹 た。全箇体中の還元儲はアラビノース、ガラクトースを ル型であった。また、ミコール酸は合有せず、リン間質 はPII型(ホスファチジルエタノールアミンを含みホス ファチジルコリン及び未知のグルコサミン合有リン脂質 を含まない)、出野なメナキノンはMK – 9(Hi)で 閲覧にメン型の2.6ージアミノアメコン製、アサアノ ース及びガラクトースを含み、細胞壁タイプIV型を示し 含むA型であった。グリコレートテストの結果はアセチ あった。間防酸は16:0, 1-15:0, 16:1, 1-1 6:0及び17:0を主成分とした。

37頁、 1986年)に属するものと考えられる。アミコラトプシス属の既知薗福を検索すると、アミコラトプシス 【0031】以上の箱果よりみて、MK299-95F4株はアミ コラトプシス(Amycolatopsis) 属 (文献:「Internatio コラトプシス・エスピー(Amycolatopsis sp.) KK299-95 nal Journal of Systematic Bacteriology」36巻. 29— ・スルフレア(Amycolatopsis sulphurea) (文献! : 同 上:および文献2:「International Journal of Systems ミコラトプシス・スルフレアの当研究所保存徴株とを実 地に比較検討中である。現時点ではMK299-95F4株をアミ FAとする。なお、MX299-95F4株を工業技術院生命工学工 近禄の種としてあげられた。そこで、MX299-95F4株とア 業技術研究所に高飥申請し、平成7年10月17日、寄託番 tic BacteriologyJ37 卷. 292- 295員, 1987年) が、 **号がFERN P.15243として受託された。**

培養する。ここで用いる栄養培地は、前配の生産歯が資 化できる炭素源と窒素源を栄養成分として含有するもの は、アミコラトプシス層に属するエポキシキノマイシン CおよびDの生産菌を栄養培地に接てし、この培地中で 【0032】第2の本発明の方法を実施するに当って

とき妖繁顔、ならびにペプトン、肉エキス、綿奥粉、大 【0033】その栄養派としては、過格徴生物の栄養源 として通常使用されるもの、例えば炭素源、窒素源、無 どう物、支芽物、物質、デキストリン、グリセリン、段 **グネシウム、塩化マンガンなどの無磁塩が使用でき、必 制などの胶水化物や、大豆油、烙花生油などの油脂のご** 一、NZーアミン、配数アンモニウム、顧数アンモニウ ム、塩化アンモニウムなどの窒素剤、さらに燐酸ニカリ ウム、燐酸ナトリウム、食塩、炭酸カルシウム、硫酸マ 野により酢塩金属例えばコパルト、鉄などを添加するこ シキノマイシンCおよびDを生産するのに使用値が利用 とができる。栄養凍としては、その他、抗生物質エポキ しうるものであればいずれの公知の栄養原でも使用でき 豆粉、酵母エキス、カゼイン、コーン・スチープリカ 機塩などの同化できる栄養源を使用できる。例えば、

【0034】培地における上記のごとを栄養源の配合割

台は特に制約されるものでなく、広範囲に亘って変える ことができ、使用するエポキシキノマイシンCおよびD 当事者であれば簡単な小規模実験により容易に決定する は、培養に先立ち殺菌することができ、この殺菌の前ま 生産的によって、最適の栄養硬の組成及び配合割合は、 ことができる。また、上記の栄養硬からなる栄養協地 たは後で、培地の p Hを6 - 8 の配囲、特に pH 6.5-7.5の範囲に調節するのが有利である。

CおよびD生産菌の培養は、一般の故様菌による抗生物 質の製造において通常使用されている方法に伴じて行な うことができる。通常は好気条件下に培養するのが好適 【0035】かかる栄養培地でのエポキシキノマイシン であり、撹拌しながら及び/または過気しながら行なぅ ことができる。また、培養方法としては静価培養、擬と う培養、通気提择をともなう液内培養のいずれも使用可 能であるが、液体培養がエポキシキノマイシンCおよび Dの大鼠生産に適している。

生物質を生産しうる範囲であれば、特に制限されるもの 【0036】使用しうる培養温度はエポキシキノマイシ ンCおよびD生産菌の発育が実質的に阻害されず、核抗 特に好ましいのは25-30℃の範囲内の温度を挙げること ができる。始養は通常はエポキシキノマイシンのおよび Dが十分に蓄積するまで根税することができる。その培 整時間は培地の組成や培養温度、使用温度、使用生産菌 株などにより異なるが、通常は72~ 120時間の培養で目 の定置に用いられる円筒平板往により定置することがで 的の抗生物質を得ることができる。培養中の培助内のエ ポキシキノマイシンCおよびDの蓄積面はスタヒロコッ カス・アウレウス・スミスを使用して、通常の抗生物質 ではなく、使用する生産菌に応じて適宜選択できるが、

培養後、必要により、確適、遠心分離などのそれ自体公 合わせて使用することにより単離精製して目的の抗生物 【0037】かくして培養物中に苦愴されたエポキシキ ノマイシンCおよびDは、これを培養物から採取する。 に酢酸エチルなどを用いた洛蟆抽出や、吸蕾やイオン交 **校能を利用したクロマトグラフィー、ゲルろ過、向流分** 配を利用したクロマトグラフィーを単独でまたは、組み 質を採取することができる。吸替やイオン交換能を有す るクロマトグラフィー用担体としては、活性成、シリカ ゲル、多れ在ポリスチワンーツピコルベンゼン街間もし た、分離した菌体からは、適当な有根語域を用いた語域 抽出法や固体破砕による溶出法により固体から目的の抗 生物質を抽出し、上配と同様に単離精製することができ る。かくして、前配した特性を育する新規化合物エポキ その培養値値を散性(plf 2-4) に腐難し有機溶媒、特 知の分離方法によって培養物から関体を除去した後に、 くは各種のイオン交換樹脂を用いることができる。ま シキノマイシンCおよびDが得られる。

2 【0038】さらに、第3の本籍明では、前配の一般式

(式中、RはエボキシキノマイシンCでは水軽原子を示 ンCおよびエポキシキノマイシンD、ならびに次の一般 で扱わされる化合物である抗生物国スポキシキノマイシ し、またエポキシキノマイシンDでは協戴原子を示す) E 14

9

2

で表わされる化合物である抗生物質エボキシキノマイシ ンA ねよびエポキシキノマイシンB、あるいはこれらの (式中、RはエポキシキノマイシンAでは塩穀原子を示 関から選ばれる少なくとも一つの化合物を有効成分とし し、またエポキシキノマイシンBTは水繋原子を示す) て含有することを特徴とする抗リウマチ剤が提供され

【0039】第3の本発明による抗リウマチ剤において は、有効成分としてのエボキシキノマイシン類あるいは 【0040】類3の本発明による抗リウマチ剤で有効成 分として用いられるエポキシキノマイシンA ねよびエポ **キシキノマイシンBは新規な物質であってのたらの物理** その製薬学的に許容できる塩は製薬学的に許容できる梯 化学的性質の詳細は特质平 7ー315542号明細書に記載さ **11ており、またこの明価者には、前記のアミコラトブシ** ス sp. MX 299—95F4株の培養によるそれらの製造法も 粉等と混ねされている形の組成物であることができる。 用の固体または液体損体、例えばエタノール、水、 記載されてある。

【0041】エポキシキノマイシンAおよびBの物理化

(1) エポキシキノマイシンAの埋化学的性状 学的性質の主なところを次に配載する。

3) 陸点: 168- 173℃ (分解)

C) 比権光度: [a] + 2+44 6" (c 0 51. メゴノ

D) TLCのRf値:028

シリカゲル (Art 105715, メルク社略) の側面サロエト

6

特間平10-45738

ゲラフィーで原配治袋としてクロロボルムーメタノール (10:1) で展開して調整した場合。

F)群外は収収スペクトラ:メかノーア語様中で遺典し たUV吸収スペクトルの主など一クは次のとおりであ [0042] E) 分子式: C.i. His NO. C.I

A max rm (c) 236(sh. 8900), 255(sh. 5900), 325(80 00) .370 (sh. 2700)

v max(cm.1) 3450, 1710, 1670, 1600, 1520, 1460, 1 G)赤外様吸収スペクトル(KBr駐利法) 340, 1230

【0043】(2) エポキシキノマイシンBの理化学的性

A)外现及び性質:液質色粉体、銅脂性物質

C) 比核光度: (a] 🕫 +32.2。 (c 0.51, メダノ B) 政点: 178- 184℃ (分解)

D) TLCのRI値:0.52

サラフィーで展開浴盤としてクロロホルムーメタノール シリカゲル (Art.105715, メルク社製) の角面クロマト (10:1)で風間して強烈した場合。

R

[0044] E) 分子式: Cn Hn NOs

F)鉄丸は吸収スペクトル:メかノール沿流中で資金し たロV吸収スペクトンの出なパークは次のとおりでお

V MAX (cm.1) 3430, 1710, 1660, 1610, 1530, 1340, 1 4 max 10 (c) 237(6100). 253(sh. 5400). 326(6300) C) 形外類吸収スペケトラ(K B r 配包符) 230 【0045】如3の本発明による抗リウマチ剤で有効成 らびにエポキシキノマイシンA およびBは、前配のとね 法は投与に適した形態をとることができ、特に経口的投 分として用いられるエポキシキノマイシンCおよびDな マイシンこねよび ひならびにエボキシキノマイシンA お よびBは特に抗リウマチ剤として使用される場合に、そ れらの投与面は症状により異なるが一般に成人一日面10 必要により1~3回に分けて投与するのがよい。投与方 り、慢性陥節投リウマチの動物攻撃モデルであるコラー **~2000mg、好生しくは20~ 600mgであり、庶状に応じて** ゲン時発問節炎を抑制する活性を有する。 エポキシキノ りあるいは**静**原的投与が留ましい。

【0046】エポキシキノマイシンA~Dは、前配に示 原化症、粘節性動脈周囲炎、潰瘍性大闘炎および苔年性 するから、便住関節リウマチのみならず、自己免疫軽減 または抑制剤として、全身性エリテマトーデス、全身性 すとおり、コラーゲン熱発陽節炎に対する抑制作用を有 間尾向きどの自己免疫的担心予防または治療にも有効に 専用することが明修できる。

8 【発明の東値の形態】次に其値例によりは発明を更に詳

聞に説明するが、本発明は下記の英施例に限定されるも

【0048】 裏施倒1 - 抗生物質エポキシキノマイシン CおよびDならびにエポキシキノマイシンA およびBの (A) グリセリン 0.5%、シュークロース 2%、大豆 常法により 120℃で20分減億した。これらの倍地に、数 天料面培地に培養したアミコラトプシスsp. MX299-95F パクトーソイトン 1%、粉末酵母エキス 0.3%、硫酸 0.5%、塩化コパルト 0.001%を含む液体箔地(向7.0に 4 株 (FERW P-15243) を接債し、その後30℃で5日間 アンモニウム 0.2%、投版セガツウム 0.2%、シリコー ンオイル | 満を合む液体培地 (叫7.4に調整) を三角フラ **スコ(500m)砕) に 110m|ずつ分注し、推法により 120℃** で20分成菌した。その後、これら培地に、上記種母培養 液をそれぞれ2■1ずつ接債し、27℃で4日間回転扱とう **羇盤)を三角フラスコ (500m1容) に 110m1ずつ分注し、** [0049] グリセリン 2%、デキストリン 2%、 **歩 1%、気破煙母1%、コーン・スチーグ・シセー** 回転版とう培養した。これにより種母培養液を得た。

【0050】このようにして得られた培養液を遠心分離 6 N-NCI により引ろにした後に酢酸ブチル 1.8 Lで抽 出して、酢酸ブチル面を無水硫酸ナトリウムにより乾燥 ノール50mlに浴かしくキサン50mlで2回浴みした。メタ ノール層を城圧下で遺稿乾固すると茶色の油状物 (980 **株(10:1. 5:1. 3:1)で質次浴出するとエボキ** シチンマイツンAがIBmg、エボキツキノレイツンBが19 ng、エポキシキノマイシンCねよびDの個合物が 170mg 得られた。この個合物のSlmgをシリカゲルTLC(Werc ボキシキノマイシンDが23mg(得られた。すなわちエボキ した。酢酸ブチル国を成圧下で濃粕乾固し、現途をメタ mg) か(得られた。この油状物をシリカゲルカラム(Werc シキノマイシンCが13mg得られ、また質かっ色粉末のエ 末として13mgの収量で得られ、またエボキシキブマイシ **ソDが陥点 163~ 168℃ (分解) の奴かっ色粉末として** して団体を除去した。 铅盤ろ被 1.8リットル (L) は、 k.Kieselgel 60, 120ml) にけし、トルエンーアセトン k.Art.105715, クロロホルムー10%合水メタノール=1 0:1で3回展開)で分離特製すると白色固体のエボキ シキノマイシンCが婚点 168~172℃ (分解) の白色粉

(L) を、6N-IICI によりpll2にした後に酢酸ブチル (B) なお、前配の(A) 項と同様にして得られた培養 2.55しで抽出し、酢酸ブチル圏を無水硫酸ナトリウムに より乾燥した。酢酸ブチル固を減圧下で濃縮乾固し、製 棟を碑過して尊体を分離した。培養ろ液2.55リットル 資をメタノール20mlに溶かしヘキサン50mlで2回洗浄 23mgの収録で得られた。

し、メタノール困を減圧下で濃結乾固した。ほられた現

値をクロロホルムーメタノールー水(50 :10:40,100m

2 油状物(0.515g) が得られた。この油状物をシリカゲル た。得られた活性面分を同条件のシリカゲルカラムクロ エポキシキノマイシンA および B の混合物が 124mg 得 5 媒:クロロホルムーメタノール, 20:1)にかけて分略 **材製した。エボキシキノマイシンAが船点 168~ 173℃** (分解)の改賞色粉末として20mgの収置で得られ、また エボキシキノマイシンBが軽点 178~ 184℃ (分解) の 1) で分配し、下層を域圧下で機絡乾固すると、茶色の 製, 50ml) に付し、トルエソーアセトン混合溶媒(10: (50:1, 20:1, 10:1, 7:1) で阿次洛出した。 れた。この混合物の35mgをシリカゲルTしC(展開浴 カラムクロマトグラフィー (Kleselgel 60. メルク社 1. 7:1. 5:1. 3:1. 2:1) で最次協田し マトグラフィーに付し、トルエンーアセトン混合溶媒 **欲数色粉末として10mgの収慮で得られた。**

スー13M NaOH - スタンーに砂路中台から0.01 N HCI - ス タノール語液中のそれぞれの紫外線吸収スペクトルであ 【図1】 ロボキシキ / マイツンCのメタノード協議中、

【図面の簡単な説明】

[図2] エボキシキノマイシンCのKB r 駐削法で開定 した赤柱様吸収スペクトルである。

特闘平10-45738

9

(私的調母:トリメチラツルン) おれ意味したプロトン 【図3】エポキシキノマイシンCの量メタノール溶液 校路製井屋スペクトルである。

(内部標準:トリメチラッかン) にて遊尾した状態13枚 【図4】 エポキシキノマイシンCの題メタノール溶液 甜気共唱スペントルである。

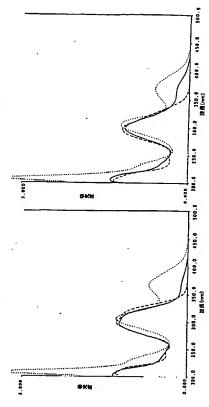
6.01N NaOHーメタノール協議中および0.01N HCIーメ タノール治液中のそれぞれの紫外線吸収スペクトルであ 【図5】 ロボキシキノマイツンロのメジノーラ箔浦中、

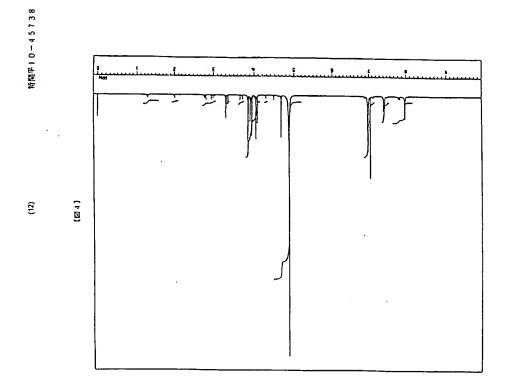
【図6】エポキシキノマイシンDのKBr駐刺法で倒花 【図7】 エポキシキノマイツンDの風メダノール治液 した赤外類吸収スペクトルである。

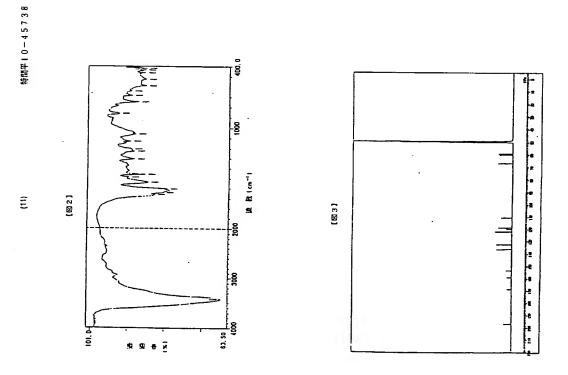
(名の音楽学・トレメチラッシン) にんぎだった プロトン 核磁気共鳴スペクトルである。

(内部職争:トリメチルション) にて測定した状衆13核 【図8】 エボキシキノマイツンDの風メかノール語演 磁気共鳴スペクトルである。

[[]





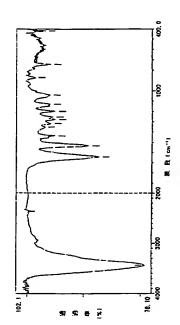


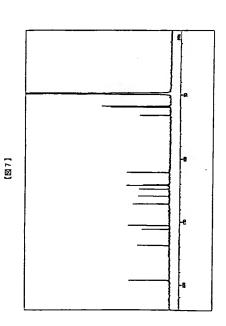


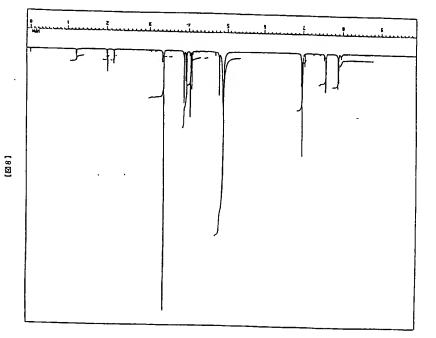
[9]

特刚平10-45738

?







フロントページの税者

(72) 発明者	(72)発明者 飯沼 寛信	(72)発明者 清田 雅	諸田 雅
	神奈川県横浜市緑区白山 4 丁目61番17号		東京都新宿区内蘇町
(72)発明者 1章 力	導力		ンス405号
	神奈川県松浦市技西四丁目6番7号	(72)発明者	(72)発明有 平野 伸一
(72)発明者			神禁川県茅ヶ崎市太
	東京都大田区田園縣布太町3番17号	(72) 発明者	(72)発明者 松本 直側

9	(72) 光明春 番田 雅	学 田屋
横浜市绿区白山 4 丁目61番17号		東京都新宿区内蘇町1番地26 秀田1757年
		ンス405号
楼梯市技西四丁目6番7号	(72) 発明者	(72)発明者 平野 伸一
		神奈川県多ヶ崎市本村5丁目8日1-207
田区田園媽布太町3番17号	(72) 発明者	(72)発明者 松本 匱頻
		神奈川県横浜市旭区さちが丘川開地3 如
		1 グリーンコーボ102

(12)発明台 石塚 独立 静岡県三島市西谷町6億59 パストラル ハイム巻節約111

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

M BLACK BORDERS
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
☐ FADED TEXT OR DRAWING
☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
OTHER:

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.